

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-092597

(43)Date of publication of application : 10.05.1986

(51)Int.Cl.

C12Q 1/18  
G01N 33/48

(21)Application number : 59-212164

(71)Applicant : KOBAYASHI SEIYAKU KK

(22)Date of filing : 09.10.1984

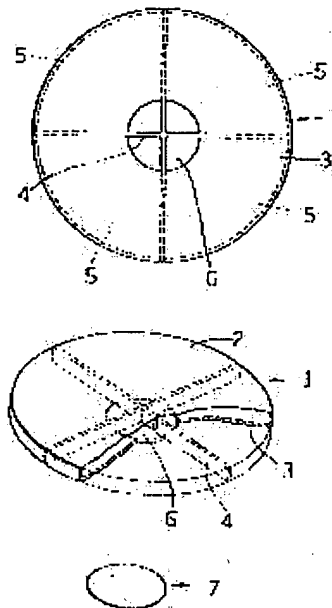
(72)Inventor : TAKAKURA TETSUYA  
ASANO KENJI  
SUGAWARA KAZUYUKI

## (54) METHOD OF EXAMINING SENSITIVITY OF BACTERIUM TO DRUG

## (57)Abstract:

PURPOSE: To inoculate molds into all the fractionated mediums in fractionated Schale having the fractionated mediums by one operation, by inoculating the molds into the fractionated Schale having a permeable sheet as a culture face.

CONSTITUTION: The top of the main body 1 of Schale is covered with the permeable sheet 2 consisting of a porous polyvinylidene fluoride film. The partition walls 4 having height reaching from the bottom 3 of the Schale to the sheet 2 is set, the small hole 6 connected to all the fractionated parts 5 made by the partition walls 4 is set at the bottom 3, and the small hole 6 is provided with the sealing material 7, to prepare quartered Schale. Pus from a patient as a test specimen is inoculated into the face of the sheet 2 of the quartered Schale by the use of a spiral plater. Consequently, total number of live molds in a unit amount of the test specimen can be calculated by measuring the number of isolated colonies in a constant area, by smear inoculation on the face of the sheet 2 with a constant density gradient. A sensitivity value to drug on a conventional standard is obtained naturally, further pattern of sensitivity of cause mold to each drug at various concentration stages can be obtained simply and rapidly.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)5月10日

C 12 Q 1/18  
G 01 N 33/488213-4B  
Z-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 細菌の薬剤感受性検査方法

⑮ 特 願 昭59-212164

⑯ 出 願 昭59(1984)10月9日

⑰ 発 明 者 高 倉 鉄 也 豊中市服部西町3-12-8 ハイッ交邦116号  
⑱ 発 明 者 浅 野 健 治 宝塚市逆瀬台2-7-30-603  
⑲ 発 明 者 菅 原 和 行 長崎市若草町15-10 市場ビル204号  
⑳ 出 願 人 小林製薬株式会社 大阪市東区道修町5丁目二五  
㉑ 代 理 人 弁理士 辻本 一義

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

細菌の薬剤感受性検査方法

## 2. 特許請求の範囲

1. 透過性シートを培養面として有する分画シャーレに菌接種を行うことを特徴とする細菌の薬剤感受性検査方法。
2. 分画シャーレは、含有薬剤の濃度の異なる培地を組み合わせたものである特許請求の範囲第1項に記載の細菌の薬剤感受性検査方法。
3. 分画シャーレは、含有薬剤の種類の異なる培地を組み合わせたものである特許請求の範囲第1項に記載の細菌の薬剤感受性検査方法。
4. 菌接種は、密度勾配を作りながらの螺旋状接種である特許請求の範囲第1項に記載の細菌の薬剤感受性検査方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、臨床材料等から分離、または分離後純培養した細菌の薬剤感受性検査方法に関する

ものである。

(従来の技術)

細菌感染症に対して化学療法を施す場合、その原因菌について最も効力のある薬剤を選定し、使用することが望ましい。しかし、細菌はその種類によって有効な薬剤の種類、及び濃度が異なり、また最近の化学療法の影響は、従来有効であった薬剤に対して耐性を示す菌株(耐性菌)の出現をうながすなど、単に感染症の原因菌を決定しただけでは、有効な薬剤を推定することは事実上不可能である。従って、臨床上適切で合理的な治療を行う上で、薬剤感受性検査は、細菌検査の中で最も重要な項目の一つにあげなければならない。

細菌の薬剤感受性検査法としては、希釈法、拡散法、比濁法等があり、希釈法には寒天培地を用いる寒天平板希釈法と液体培地希釈法が、そして拡散法には感応錠法、感受性ディスク法、傾斜平板法、直立拡散法等がある。しかし、実際の細菌検査においては、操作性の面から寒天平板希釈法と感受法ディスク法が主に用いられている。

感受法ディスク法は、薬剤を含まない培地に被検菌を接種したのち、薬剤を含ませたペーパードискを培地上に置き、一定時間培養後薬剤の拡散に従って生じる被検菌の発育阻止円または阻止帯をもって判定する方法である。この方法は、操作が簡単な上、一枚のシャーレで複数の薬剤及び濃度について検査できるため広く利用されているが、反面、ディスクを置く培地の厚さや傾きあるいは種類等により阻止円の大きさが変動しやすく再現性に欠ける面がある。また、阻止円の大きさでなく、その有無のみで判定を行う3濃度ディスク法もあるが、薬剤濃度の設定幅が大きく被検菌の最小発育阻止濃度(MIC)などを測定するには不向である。

寒天平板希釈法は、予め一定濃度に薬剤を含有させた培地を用いるため再現性も良く、また薬剤濃度の設定も自由である。しかし、一つの薬剤または濃度設定で1枚の培地を必要とし、接種操作も各培地毎に行わねばならず煩雑である。

また、従来の薬剤感受性検査は治療指針を得る

ことを目的としているため、全ての菌の発育が阻止される薬剤濃度を重視しており、各々の薬剤濃度における被検菌株の薬剤感受性の度合いについてはあまり注目されなかった。しかし、より複雑化の傾向にある感染症に対して、一層適切な指針を得るためにも、原因菌についてのさらに詳細な情報をつかむ必要がある。

(発明が解決しようとする問題点)

この発明は、上記従来法の培地作製及び接種時の操作の煩雑さ、並に感受性ディスク法の再現性の低さ等の問題点を解決しようとするものである。

(問題点を解決するための手段)

そこで、この発明の方法では、透過性シートを培養面として有する分画シャーレを用いて、各分画に含有薬剤の種類異なる培地、または同種で濃度の異なる薬剤含有培地を組み合せ、菌接種を行うことにより、上記従来方法の問題点を解決している。

(作用)

上記手段を施した結果、分画シャーレの各分画培地へ一操作で各分画培地の全部に菌接種を行うことができるようになった。

(実施例)

以下、この発明の方法の実施例を説明する。

実施例では、図示したようなシャーレ本体(1)の上縁口部を透過性シート(2)で被覆し、シャーレ本体(1)にシャーレ底部(3)より透過性シート(2)に達する高さの隔壁(4)を設け、シャーレ底部(3)に前記隔壁(4)により生ずる分画部(5)の全てに連通した小孔(6)を設け、さらに小孔(6)に封止体(7)を設けた4分画シャーレを用いた。

前記透過性シート(1)として、多孔性フッ化ポリビニリデン膜(孔径0.45 $\mu$ )を使用した。培地としては、ミュラーヒントン(Müller-Hinton)培地を使用し、表1に示す薬剤濃度になるよう各々の薬剤の希釈溶液の一定量を培地に添加し、シャーレに1分画をコントロールとして残し、3つの分画に薬剤濃度に従い3段階ずつ分注、凝

固させた。(1シャーレ3段階であるから12段階で4枚のシャーレを要した。)また、コントロール培地としては薬剤を含まないミュラーヒントン培地を分注した。

そこで先ず、患者からの膿を検体として用手法により、前記4分画シャーレの透過性シート(2)面に接種した。

次に、患者からの膿を直接法にてスパイラルプレーター(スパイラル・システム・インストルメンツ社;米国)を用いて接種した。このスパイラルプレーターは、米国においてFDAにより開発、評価された生菌数測定用の自動化システム中の接種装置であるが、この装置における接種は培地中心部より検査材料に密度勾配を作りながら、螺旋状に塗抹するものである。

従って、この発明の方法では一定の密度勾配によって透過性シート(2)面に塗抹接種すると、孤立集落の数を一定面積について計測するだけで、検査材料の単位量中の全生菌数を算出することができ、さらに従来基準での薬剤感受性値はもち

ろんのこと、原因菌の各薬剤に対する種々の濃度段階での感受性のパターンを簡便かつ迅速に得ることができる。

上記スパイラルプレーターを用いた結果、この検体中の病原菌としてスチフィロコッカス・オーレウス (staphylococcus aureus) が  $2.8 \times 10^4$  CFU/ml の割合で分離された。

従来の発育の有無による判定基準を用いるならば、表1より前記分離菌に対するABPCのMIC値は  $1.56 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、同様にCTMでは  $0.78 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、CZXでは  $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、GMでは  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上、NFLXでは  $3.13 \mu\text{g}/\text{ml}$  と判定できる。

また、各薬剤の各々の濃度における孤立集落数の変化に注目するならば、従来基準ではGMのMIC値は  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上となるが、実際には  $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で被検菌中の約50%の菌は感受性を示していることが読みとれる。

(以下余白)

病原菌: staphylococcus aureus コントロール培地: Müller-Hinton 培地 ( $2.8 \times 10^4$ CFU/ml)						
薬剤名 薬剤濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	ABPC (CFU/ml)	CTM (CFU/ml)	CZX (CFU/ml)	GM (CFU/ml)	NFLX (CFU/ml)	
0.025	$2.7 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$	
0.05	$2.8 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$	
0.1	$2.9 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	
0.2	$2.6 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	$3.0 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$	
0.39	$4.3 \times 10^3$	$1.8 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$	
0.78	$1.2 \times 10^3$	0	$2.5 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$	
1.56	0	0	$5.8 \times 10^3$	$2.9 \times 10^4$	$3.5 \times 10^3$	
3.13	0	0	$3.6 \times 10^2$	$2.6 \times 10^4$	0	
6.25	0	0	0	$1.7 \times 10^3$	0	
12.5	0	0	0	$8.0 \times 10^2$	0	
25	0	0	0	$6.8 \times 10^1$	0	
50	0	0	0	$6.2 \times 10^0$	0	

ABPC: ampicillin CTM: cefotiam CZX: ceftizoxime  
GM: gentamicin NFLX: norfloxacin

#### (発明の効果)

この発明の方法によれば、培養面として透過性シートを利用するため分画シャーレにもかかわらず、非常に平らな培養面を確保することができるので、用手法による菌接種を容易にするばかりでなく、スパイラルプレーター (スパイラル・システム・インストルメンツ社: 米国) のような自動接種器の利用も可能とするものであり、優れた効果を有する。

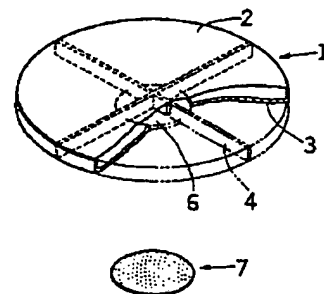
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図はこの発明の細菌の薬剤感受性検査方法に用いる分画シャーレの一実施例を示す分解斜視図、第2図はその分画シャーレの封止体を取外した状態の底面図である。

(2) …透過性シート (5) …分画部

代理人 弁理士 辻 本 一 義

第1図



第2図

